

Análise da expressão dos alelos S em pereira ‘Rocha’

Lucélia R. Tavares, Mariana Mota & Cristina M. Oliveira

Secção de Horticultura, Departamento de Produção Agrícola e Animal,
Instituto Superior de Agronomia. Tapada da Ajuda, 1349-017, Lisboa, Portugal,
lucelia.t@sapo.pt, mariana@isa.utl.pt, crismoniz@isa.utl.pt

Resumo

Neste trabalho foram determinados os genes de incompatibilidade (alelos S) expressos em pereira ‘Rocha’. Estes, quando comparados com os alelos de outras cultivares de pereira, poderão constituir instrumentos preciosos na escolha das cultivares polinizadoras a utilizar na instalação de um pomar de pereira ‘Rocha’. Para tal, recorreu-se a técnicas de biologia molecular que incluíram a extracção de RNA de pistilos de três clones da cultivar ‘Rocha’ (R1, R2 e R4C) e a amplificação, clonagem e sequenciação de fragmentos obtidos por RT-PCR. As flores utilizadas na extracção de RNA foram isoladas antes da antese, para garantir a não existência de pólen de outras cultivares nos pistilos interferindo no processo de rejeição do auto-pólen. Analisando as sequências genéticas obtidas dos três clones, verificou-se não existirem diferenças entre clones e as sequências corresponderem aos alelos Sj e Sa. A pereira ‘Rocha’ é, portanto, semi-compatível com cultivares que apresentem alelos Sj ou Sa, totalmente incompatível com cultivares portadoras dos alelos Sj e Sa e totalmente compatível com cultivares que não sejam portadoras dos alelos Sj e Sa.

Palavras-chave: incompatibilidade gametofítica, polinizadoras, S-RNase, RT-PCR, *Pyrus communis*

Abstract

Analysis of the expression of S alleles in ‘Rocha’ pear. In this work, the expression of incompatibility genes (S-alleles) in ‘Rocha’ pear was investigated. The comparison of these alleles with the alleles of other cultivars may constitute a tool to help the technicians and farmers to choose pollinators when planning a new ‘Rocha’ orchard. We have used molecular techniques that include pistil RNA extraction from three clones of cultivar ‘Rocha’ (R1, R2 and R4C), fragment amplification by RT-PCR, cloning and sequencing. The flowers utilized to extract RNA were isolated before anthesis to guarantee the absence of pollen from other cultivars in their pistils, which could interfere with the rejection process of the auto-pollen. Analysing the genetic sequences obtained from the three clones, no differences between clones were detectable and the sequences corresponded to Sj and Sa alleles. ‘Rocha’ pear is semi-compatible with cultivars which do not present Sj or Sa, totally incompatible with cultivars that carry Sj and Sa, and totally compatible with cultivars that do not carry Sj and Sa.

Keywords: Gametophytic self-incompatibility, pollinators, S-RNase, RT-PCR, *Pyrus communis*.

Introdução

A produção de peras encontra-se entre as maiores produções de frutos de todo o mundo, sendo o seu maior produtor a China. A Europa detém 18,5 % da produção mundial, ocupando Portugal o sétimo lugar na Europa com 131 000 t, correspondentes ao cultivo de 11 000 ha (FAOSTAT, 2006). Em Portugal, a pereira ‘Rocha’ representa

96 % da produção de peras (COTHN, 2005). Tem-se registado também nos últimos anos uma importância crescente desta cultivar nas exportações portuguesas (FAOSTAT, 2006).

Na produtividade num pomar de pereiras, a polinização e o vingamento assumem papéis muito importantes. Embora seja necessário polinizar apenas 5 % das flores (Silva, 1998) para garantir uma produção economicamente viável num pomar comercial, existem vários fenómenos nas fruteiras que podem dificultar essa tarefa, pois promovem a redução do vingamento (Silva, 1998). Na pereira, a incapacidade de desenvolvimento de tubos polínicos no estilete devido ao fenómeno de incompatibilidade gametofítica (GSI), por vezes designado por auto-incompatibilidade gametofítica, é o principal factor do mau vingamento dos frutos. A auto-incompatibilidade gametofítica resulta da incapacidade do pólen fecundar os óvulos que contenham um alelo idêntico àquele de que é portador devido ao bloqueio do tubo polínico no estilete. Como consequência, a planta não tem a capacidade de se auto-polinizar.

A pereira ‘Rocha’ apresenta incompatibilidade gametofítica, ainda que esta, segundo alguns autores, possa não ser total (Silva, 1998). Esta cultivar de pêra tem ainda a capacidade de originar frutos apenas com o estímulo do pólen sem ocorrência de fecundação, originando frutos sem sementes, ou seja, por partenocarpia. No entanto, a quantidade de frutos produzidos deste modo parece insuficiente para sustentar produções economicamente viáveis, recorrendo-se por esse motivo à aplicação de reguladores de crescimento, como o ácido giberélico, quando estão abertas 20 a 50 % das flores (Soares et al., 2001).

Adicionalmente, os frutos produzidos com recurso a reguladores de crescimento, devido ao seu reduzido ou inexistente conteúdo em sementes, apresentam certas desvantagens, tais como uma forte queda após o vingamento e uma produção de frutos com menores calibres e com forma mais alongada. Ainda é referido por alguns autores uma menor qualidade traduzida por uma menor quantidade de açúcares, por uma menor dureza da polpa, por maiores perdas de peso, por pior conservação em câmara frigorífica e por maior susceptibilidade à ocorrência de carepa (CTIFL, 1991; Silva, 1998; Soares et al., 2001).

As crescentes preocupações do consumidor ao nível ambiental e com a segurança alimentar, poderão conduzir, num futuro próximo, a restrições à aplicação de reguladores de crescimento. Para prevenir esta situação, será necessário dispor de técnicas alternativas que promovam uma eficiente polinização e bons vingamentos (Sousa, 2003; Mota & Oliveira, 2005).

Assim, devido à auto-incompatibilidade da pereira, os pomares de pereira ‘Rocha’ não deverão ser monovarietais, para permitir a polinização cruzada e, consequentemente, um bom vingamento. Desta forma deverão existir duas ou três cultivares com pólen compatível (alelos diferentes) no pomar, com simultaneidade na época de floração, com regularidade na produção e, se possível, capazes de produzir frutos com valorização comercial. Por outro lado, deverão também existir insectos polinizadores e condições climáticas favoráveis a uma eficiente polinização (Silva, 1998).

As técnicas de análise molecular têm-se revelado uma importante ferramenta na determinação da compatibilidade sexual entre plantas, com vantagens em relação a outras técnicas que são influenciadas por factores fisiológicos e ambientais. Existe um gene que apenas se expressa no pistilo e que controla a produção de uma S-RNase (Zisovich et al., 2004a). Esta proteína é uma ribonuclease capaz de reconhecer e

degradar o RNA do pólen, impedindo o alongamento do tubo polínico e a consequente fecundação do óvulo (Ishimizu et al., 1998). Um outro gene que se encontra muito próximo do anterior apenas se expressa no pólen e é específico deste (de Nettancourt, 1977). Este gene codifica um determinante que permite o reconhecimento, por parte da S-RNase, se está perante um cruzamento compatível ou incompatível (Hiratsuka et al., 2004).

O conhecimento dos alelos de incompatibilidade (designados por alelos S) das diversas cultivares de pêra permite escolher as polinizadoras compatíveis e instalar pomares que se "auto-polinizem" e originem produções competitivas, sem ser necessário recorrer a reguladores de crescimento.

O presente trabalho pretende, desta forma, caracterizar a informação transcrita dos alelos S da incompatibilidade da pereira 'Rocha', para comparações futuras com alelos de outras cultivares.

Material e Métodos

Material vegetal: Para cada clone, foram isolados cerca de 40 corimbos no estádio E (botão branco) de árvores pertencentes aos clones R1, R2 e R4C, plantadas na Estação Nacional de Fruticultura de Vieira Natividade (Alcobaça). Os corimbos foram envolvidos em sacos de pano, onde permaneceram isolados dois dias. Depois de colhidos, os corimbos foram refrigerados e transportados para o laboratório. De cada flor, foram colhidos o estigma e a zona superior do estilete, após o que foram mergulhados em água gelada, para diminuir oxidações provenientes do corte e exposição ao ar dos tecidos. De seguida, o material foi congelado com azoto líquido e posteriormente mantido a -80 °C até à extracção de RNA.

Extracção de RNA: A extracção foi feita com CTAB segundo o método de Chang et al. (1993) adaptado para o material em estudo. Utilizou-se 10 ml de solução CTAB (com 3 M NaCl e 2 % (v/v) β -ME) para 600 mg de estigmas e estiletos. A extracção eficaz de polissacáridos foi assegurada pelo enriquecimento do tampão em NaCl (concentração final 3 M). Foram feitas extracções de CI (24:1) para retirar proteínas do material, antes da precipitação com 1/4 do volume de LiCl. O RNA foi recolhido por centrifugação e dissolvido em SSTE. Procedeu-se de novo à eliminação de proteínas com CI (24:1) e foi feita uma reprecipitação de RNA com etanol absoluto. A lavagem do pellet obtido foi efectuada com etanol 70 %. Este foi depois seco e dissolvido em água tratada com DEPC. A pureza e concentração do extracto obtido foram estimadas por espectrofotometria e em gel de 1,4 % formaldeído em 1X MOPS/EDTA (Fourney et al., 1988).

Transcrição reversa: Preparou-se uma reacção inicial contendo 3,85 μ M de dT_{VN} (5'TTTTTTTTTTTTVN3'), 760 μ M de dNTPs, 3 μ g de RNA, que foi colocada durante 5 min a 65 °C. Juntou-se à reacção anterior 5 \times First Strand Buffer, DTT, RNase Inhibitor e Superscript III, para que a reacção final fosse constituída por: 2,5 μ M de dT_{VN}, 500 μ M de dNTPs, μ g de RNA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3 a 25 °C), 75 mM KCl e 3 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 40 U RNase Inibitor e 200 U Superscript III (Invitrogen). Esta depois foi incubada durante 1 h a 50 °C e posteriormente 15 min a 70 °C.

Desenho dos iniciadores específicos: Os iniciadores utilizados foram Sall-F (5'TTTACGCAGCAATATCAGC3') de acordo com Mota & Oliveira (2005) e Sall-R2 (5'AGWSHGAYCTRACYAATTC3'). Sall-R2 foi desenhado numa região conservada das sequências nucleotídicas de alelos S de *Pyrus communis* já armazenados no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os iniciadores foram sintetizados por Thermo Electron Corporation.

Amplificação dos fragmentos do gene codificante da S-RNase: A reacção foi realizada num volume total de 25 µl contendo 0,08 a 0,1 da reacção anterior, 60 mM Tris-Cl, 6 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄ (pH8,3 a 25 °C), 0,5 mM MgCl₂, 1,25 U Accuzyme (Bioline), 0,2 mM de cada iniciador (Sall-F e Sall-R2) e 200 µM dNTPs. A reacção de PCR foi efectuada num termociclador Biometra UNO, programado para uma desnaturação inicial de 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 min a 52 °C, 2,5 min a 72 °C e uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos amplificados foram analisados num gel de agarose a 2 % em 1X TAE, depois de as amostras terem corrido 1 h a 120 V e visualizados num transiluminador de UV, depois de corado com brometo de etídio. O marcador utilizado foi GeneRuler™ 100 bp Ladder (Fermentas)

Clonagem no vector pCRII: Os produtos de PCR foram incubados com 0,5 U Taq polimerase (Bioline) (sem actividade “proof reading”) a 72 °C, durante 10 min, para a adição de A nas extremidades. Os fragmentos foram clonados no vector pCRII (Invitrogen) seguindo-se as normas do fabricante, sem ser realizada qualquer purificação dos produtos de PCR. Foram feitas culturas líquidas das colónias transformadas e preparações de DNA plasmídico em pequena escala das colónias transformadas através de lise alcalina (Sambrook et al., 1989).

Distinção dos alelos: A distinção entre alelos foi feita através de digestão enzimática de fragmentos dos alelos S amplificados por PCR. As enzimas escolhidas foram EcoRI (não digere Sj, mas digere Sa) e HindIII (não digere Sa, mas digere Sj). Fez-se uma reacção de 12 µl para a digestão com EcoRI (Fermentas), contendo 8 µl de produto PCR, 5 mM Tris-HCl (pH 7,5 a 25 °C), 1 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 0,002 % Triton X-100, 0,01 mg/ml BSA e 10 U de EcoRI e fez-se outra, também de 12 µl para a digestão com HindIII (Fermentas), contendo 8 µl de produto PCR, 1 mM Tris-HCl (pH 8,5 a 25 °C), 1 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,01 mg/ml BSA e 10 U de HindIII e deixou-se a digerir durante 14 h a 37 °C. Os produtos foram visualizados por electroforese.

Amplificação dos fragmentos clonados para sequenciação: Efectuou-se um PCR numa reacção de 100 µl, utilizando Accuzyme (Bioline). Utilizaram-se iniciadores específicos do vector pCRII (M13-48(rev) 5’AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA3’ e T7SEQ 5’CGTAATACGACTCACTATAGG 3’). A reacção decorreu como descrito anteriormente, mas agora utilizando 0,8 a 1,2 µl de DNA plasmídico, 5 U de Accuzyme e tendo como temperatura de emparelhamento 58 °C. A presença dos produtos amplificados foi analisada por electroforese.

Purificação: A purificação foi efectuada com QUIAGEN PCR Purification Kit (QUIAGEN), segundo as normas do fabricante.

Sequenciação: A sequenciação dos fragmentos foi realizada de forma automática pela empresa STAB Vida com iniciadores específicos do vector (T7 fwd e M13 rev). Para cada fragmento foram sequenciadas as 2 cadeias para que depois de comparadas se possam minimizar possíveis erros de sequenciação.

Análise das sequências: As sequências obtidas foram analisadas com recurso ao software Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) e alinhadas recorrendo ao software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). As análises de homologia foram feitas recorrendo ao software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Recorreu-se ao software (Sequence Manipulation Suite) para obter a sequência complementar invertida, quando necessário (http://bioinformatics.org/sms2/rev_comp.html).

Resultados

Cada um dos clones analisados apresentou, como resultado da amplificação do cDNA com iniciadores específicos, uma banda de peso molecular aproximado de 500 bp. A intensidade da banda da amostra R1 apresenta-se mais ténue que as restantes (R2 e R4C) (Fig. 1a). Esta banda única, observada em gel de agarose, contém os dois produtos expressos amplificados, correspondentes à informação expressa pelos alelos S numa cultivar diplóide.

Contudo, o contributo de cada alelo para o padrão de expressão não é distinguível somente por electroforese, tendo sido possível fazer a sua identificação apenas através do padrão de digestão obtido com as enzimas de restrição. Um dos alelos apresenta uma banda estimada de 273 bp e outra de 230 bp, quando digerido com HindIII, e uma banda de 503 bp, quando digerido com EcoRI. O outro alelo apresenta uma banda de aproximadamente 495 bp quando digerido com HindIII e duas (351 e 144 bp) quando digerido com EcoRI (Fig. 1b).

Foi confirmada, desta forma, a existência da expressão dos dois alelos S nos três clones. As sequências de nucleótidos obtidas de cada alelo a partir dos produtos transcritos expressos no pistilo das flores são iguais nos 3 clones analisados, apenas se observando diferenças na zona do iniciador degenerado Sall-R2 (Fig. 2). Estas sequências apresentam elevada homologia com sequências existentes na base de dados GenBank. Os dois alelos foram identificados como sendo Sj e Sa, concordando com os resultados obtidos por Mota & Oliveira (2005) através do isolamento de sequências parciais dos alelos de DNA genómico.

Discussão

Neste trabalho, foram analisados três clones (R1, R2 e R4C) da pereira ‘Rocha’ para averiguar se os alelos se expressam neles de forma constante e, assim, poder assegurar a representatividade dos resultados para a cultivar, independentemente do clone. O material usado como amostra foi constituído por estigmas e parte superior do estilete, onde ocorre a reacção de rejeição da GSI. O isolamento dos corimbos pretendeu garantir a ausência de pólen de outras plantas nas flores a analisar, pois este poderia perturbar as determinações a efectuar.

As reacções de amplificação foram mediadas por uma polimerase com uma elevada fidedignidade na amplificação por apresentar actividade “*proof reading*”, evitando a dificuldade resultante de, existindo diferenças entre as sequências quando se caracterizam clones de uma mesma cultivar, estas serem muito pequenas, podendo por isso ser confundidas com erros de polimerização, que podem ocorrer frequentemente com as DNA polimerases correntemente utilizadas. Com esta metodologia não se verificou a ocorrência de diferenças entre clones, ou seja, os 3 clones apresentam sequências expressas parciais idênticas. As diferenças verificadas entre sequências resultam da utilização de um iniciador com nucleótidos degenerados, não devendo por isso ser consideradas.

Estes resultados sugerem que tal como não deverá ser possível originar produções com frutos de qualidade com recurso à polinização intra-clones, também a polinização inter-clones não deverá ser possível, corroborando com os resultados obtidos em Silva & Sousa (2005). Nesse trabalho, o número médio de sementes por fruto em cruzamentos sem polinizadoras oscilou entre 0 e 1, devido à GSI, enquanto na presença de polinizadoras variou entre 4 e 7. O reduzido número de sementes em cruzamentos incompatíveis resulta, como em outras cultivares (Tassinari et al., 2004), da incompatibilidade parcial.

De acordo com estes resultados, a instalação de vários clones em pomares de 'Rocha' não poderá assegurar uma polinização eficaz. Contudo, poderá ser benéfica por diminuir a probabilidade de especialização de insectos e de patogénios. Para que a pereira 'Rocha' possa ser polinizada dando origem a produções de qualidade deverão ser utilizadas, como polinizadoras, cultivares que não apresentem na sua constituição genética os alelos de incompatibilidade S_j e S_a em simultâneo. Se as polinizadoras apresentarem apenas um destes dois alelos, o cruzamento será semi-compatível, ou seja, só poderão vingar metade dos frutos que potencialmente poderiam existir de acordo com a quantidade de pólen produzido. Se as polinizadoras não apresentarem nem S_a nem S_j, isto é, apresentarem dois alelos de incompatibilidade diferentes dos presentes na pereira 'Rocha', o cruzamento é considerado totalmente compatível. Assim poderão vingar todos os frutos que o potencial da pereira 'Rocha' permitir.

Tem sido verificado em outros trabalhos (Tassinari et al., 2004) que a quantidade de frutos vingados ou produzidos não é forçosamente superior em cruzamentos totalmente compatíveis comparando com os incompatíveis. Desta forma, não é de excluir o potencial das polinizadoras semi-compatíveis. A produção de frutos com sementes, recorrendo à polinização, deverá permitir a redução da queda após o vingamento, uma vez que esta é maior nos frutos partenocárpicos. Desta forma, poder-se-á reduzir o recurso à aplicação de substâncias de síntese com o objectivo de reduzir a queda após o vingamento.

Também o recurso a mondas de frutos, que tem sido utilizado nos últimos anos em pomares de pereira 'Rocha' de forma a potenciar a qualidade dos frutos, poderá ser atenuado em resultado da utilização de diversos tipos de polinizadoras. A utilização de cultivares polinizadoras que possam assegurar logo ao vingamento um número de frutos não excessivamente elevado poderá eventualmente conduzir, no futuro, a mondas menos intensas e consequentemente a menores encargos com a mão-de-obra.

Neste sentido, deveria ser realizada uma experimentação sistemática, com diversos binómios 'Rocha'/polinizadora e em diversas condições climáticas representativas de cada região produtora, de forma a estudar a produtividade e a qualidade dos frutos, podendo constituir um instrumento de decisão importante aquando da instalação de novos pomares, de acordo com o objectivo de cada exploração.

Referências

- Chang, S., Puryear, J. & Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11: 113-116.
- COTHN, 2005. Relatório de Balanço da campanha da Pêra 2005. Disponível em: <http://www.cothn.pt>. Acesso em: 01/05/2006.
- CTIFL, 1991. *Le poirier*, Éditions CTIFL. Paris.
- De Nettancourt, D. 1977. *Incompatibility in Angiosperms*. Springer. Berlin.
- Faostat. Agriculture & Food Trade. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat>. Acedido em 20/03/2006.
- Fourney, R.M., Miyalcoshi, J., Day III, R.S. & Paterson, M.C. 1988. Northern Blotting: Efficient RNA Staining and Transfer. *Focus*, 10: 5-7.
- Hiratsuka, S., Hirano, A., Kawai, Y. & Zhang, S.L. 2004. Self-Incompatibility in Japanese Pears: Peculiar Inhibitory Action of S-RNase on Self Pollen-Tube Growth in Vitro. *Acta Hort.* 636: 347-355.
- Ishimizu, T., Endo, T., Yamaguchi-Kabata, Y., Takamura, K.T., Sakiyama, F. & Norioka, S. 1998. Identification of regions in which positive selection may

- operate in S-RNase of Rosaceae: Implication for S-alleles-specific recognition sites in S-RNase. *FEBS Letter*, 44: 337-342.
- Mota, M. & Oliveira, C.M. 2005. Identificação de alelos S na pereira 'Rocha' e determinação da compatibilidade entre cultivares. *Actas Port. Hort.* 6: 232-238.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* 1. 2ª edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press. EUA.
- Silva, L.A.T. 1998. Polinização e partenocarpia na pereira cv. Rocha. Algumas observações e ensaios de campo. Relatório de fim de curso de engenheiro agrónomo. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- Silva, L. & Sousa, R. 2005. Polinização. In APAS, INIAP/ENFVN, INIAP/LQARS, DGPC (eds.). *Manual Técnico de Produção Integrada de Pêra 'Rocha'*. pp. 43-51.
- Soares, J., Silva, A. & Alexandre, J. 2001. *O Livro da Pêra Rocha*. vol. 1. Associação Nacional dos Produtores de Pêra Rocha. Cadaval.
- Sousa, R.M. 2003. Para quê utilizar variedades polinizadoras nos pomares. *Crisopa*, 46. (Série II): 4-5.
- Tassinari, P., Zuccherelli, S. & Sansavini, S. 2004. Self Pollination and Fertility in European Pear (*Pyrus communis* L.) Cultivars. XIth Eucarpia Symp. on Fruit Breed. & Genetics. Eds. F. Laurens e K. Evans. *Acta Hort.* 63: 677-680.
- Zisovich, A.H., Stern, R.A., Sapir, G., Shafir, S. & Goldway, M. 2004a. The RHV region of S-RNase in the European pear (*Pyrus communis*) is not required for the determination of specific pollen rejection. *Sex Plant Reprod.* 17: 151-156.

Figuras

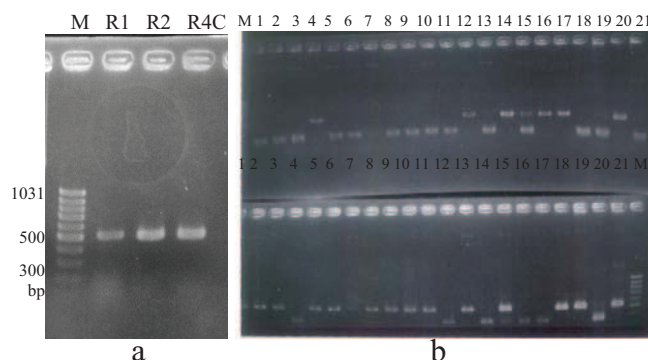


Figura 1 – a) Electroforese dos fragmentos amplificados por RT-PCR dos clones R1, R2 e R4C; b) Electroforese dos produtos de PCR amplificados com Sall-F e Sall-R2, digeridos com Hind III (em cima) e EcoRI (em baixo); (1 a 7 - fragmentos dos alelos Sa e Sj do clone R1; 8 a 14 - fragmentos dos alelos Sa e Sj do clone R2; 15 a 21 - fragmentos dos alelos Sa e Sj do clone R4C; M - marcador GeneRuler™ 100 bp Ladder).

a

```

RR27 TTTACGCAGCAATATCAGCTGGCTGTCTGCCACTTTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAA 100
RR46 TTTACGCAGCAATATCAGCTGGCTGTCTGCCACTTTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAA 100
RR14 TTTACGCAGCAATATCAGCTGGCTGTCTGCCACTTTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAA 100
*****
RR27 ACAGCACAGGAAATGACCCAATGTACTGCAAGAAATACAACCTTGAATTCTACTAAGATAGCAAATCTGACAGCCCAGTTGGAAATTATTTGGCCCAACGT 200
RR46 ACAGCACAGGAAATGACCCAATGTACTGCAAGAAATACAACCTTGAATTCTACTAAGATAGCAAATCTGACAGCCCAGTTGGAAATTATTTGGCCCAACGT 200
RR14 ACAGCACAGGAAATGACCCAATGTACTGCAAGAAATACAACCTTGAATTCTACTAAGATAGCAAATCTGACAGCCCAGTTGGAAATTATTTGGCCCAACGT 200
*****
RR27 ACTTGATCGAACCGATCATATAACCTTCTGGAATAAACAGTGGAACAAACATGGCAGCTGTGGGCGTCCCGCAATACAGAACGACATGCATTACTTGCAG 300
RR46 ACTTGATCGAACCGATCATATAACCTTCTGGAATAAACAGTGGAACAAACATGGCAGCTGTGGGCGTCCCGCAATACAGAACGACATGCATTACTTGCAG 300
RR14 ACTTGATCGAACCGATCATATAACCTTCTGGAATAAACAGTGGAACAAACATGGCAGCTGTGGGCGTCCCGCAATACAGAACGACATGCATTACTTGCAG 300
*****
RR27 ACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGCTCTCTGAAATCCTCTCAAAGGCGAAGATTGAACCGGTGGGGAGATTCTGGACACAGAAGGAAA 400
RR46 ACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGCTCTCTGAAATCCTCTCAAAGGCGAAGATTGAACCGGTGGGGAGATTCTGGACACAGAAGGAAA 400
RR14 ACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGCTCTCTGAAATCCTCTCAAAGGCGAAGATTGAACCGGTGGGGAGATTCTGGACACAGAAGGAAA 400
*****
RR27 TTGAAAGGCCATACGCAAGGTACCAACAATAAGGAACCAAACTCAAGTGCCAAAGGAATACTCAGGGGACTGAATTGGTCGAGATCTCTCT 494
RR46 TTGAAAGGCCATACGCAAGGTACCAACAATAAGGAACCAAACTCAAGTGCCAAAGGAATACTCAGGGGACTGAATTGGTCGAGATCTCTCT 494
RR14 TTGAAAGGCCATACGCAAGGTACCAACAATAAGGAACCAAACTCAAGTGCCAAAGGAATACTCAGGGGACTGAATTGGTCGAGATCTCTCT 494
*****

```

b

```

RR13 TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGCCTGCAATTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAA 100
RR44 TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGCCTGCAATTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAA 100
RR23 TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGCCTGCAATTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAA 100
*****
RR13 ACTCTAATGGACCTGACCCAGTAACTGCAAGCCGAAACCAAGGTGCCTCAGGCGCAGCAGCCGATAGATCCATCACTCAAACCCAGTTGGAAATTAT 200
RR44 ACTCTAATGGACCTGACCCAGTAACTGCAAGCCGAAACCAAGGTGCCTCAGGCGCAGCAGCCGATAGATCCATCACTCAAACCCAGTTGGAAATTAT 200
RR23 ACTCTAATGGACCTGACCCAGTAACTGCAAGCCGAAACCAAGGTGCCTCAGGCGCAGCAGCCGATAGATCCATCACTCAAACCCAGTTGGAAATTAT 200
*****
RR13 TTGGCCGAACGTATTCAATCGAGCCGATAATGAAAGCTTCTGGAATAAACAGTGGGACAAACATGGCACCTGTGGGTATCCCAATAAAAGACAAGAAC 300
RR44 TTGGCCGAACGTATTCAATCGAGCCGATAATGAAAGCTTCTGGAATAAACAGTGGGACAAACATGGCACCTGTGGGTATCCCAATAAAAGACAAGAAC 300
RR23 TTGGCCGAACGTATTCAATCGAGCCGATAATGAAAGCTTCTGGAATAAACAGTGGGACAAACATGGCACCTGTGGGTATCCCAATAAAAGACAAGAAC 300
*****
RR13 CATTACCTTCAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGCTCTCTCAAATCCTATCCAAAGCCAACATCAATCCAGACGGTATAGGCAGGA 400
RR44 CATTACCTTCAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGCTCTCTCAAATCCTATCCAAAGCCAACATCAATCCAGACGGTATAGGCAGGA 400
RR23 CATTACCTTCAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGCTCTCTCAAATCCTATCCAAAGCCAACATCAATCCAGACGGTATAGGCAGGA 400
*****
RR13 CACGGAAGCTAATTGAAAATGCCATACGCAATGGTACCAACGATAAGGAACCAAACTCAAGTGCCAAAAGAATAATGGGACTATTGAATTGGTTCGAGGT 500
RR44 CACGGAAGCTAATTGAAAATGCCATACGCAATGGTACCAACGATAAGGAACCAAACTCAAGTGCCAAAAGAATAATGGGACTATTGAATTGGTTCGAGGT 500
RR23 CACGGAAGCTAATTGAAAATGCCATACGCAATGGTACCAACGATAAGGAACCAAACTCAAGTGCCAAAAGAATAATGGGACTATTGAATTAGTTCGAGGT 500
*****
RR13 CGCTCT 506
RR44 CTCTCT 506
RR23 CGCTCT 506
* ****

```

Figura 2 – Sequência de nucleótidos dos 3 clones dos alelos a) Sa; b) Sj (* - nucleótidos iguais; espaço - nucleótidos diferentes; amostras RR14 e RR13 - clone R1; amostras RR27 e RR23 - clone R2; amostras RR46 e RR44 - clone 4C).